

201524022A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）

構造活性相関および、カテゴリーアプローチの

実用化に関する研究

(H27-化学-指定-005)

平成27年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成28（2016）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

化学物質のヒト健康リスク評価における (定量的) 構造活性相関および、  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究 \_\_\_\_\_ 1

本間 正充

II. 分担研究報告書 (別添 4)

エームス変異原性の予測精度の向上に関する研究 \_\_\_\_\_ 9

本間 正充

In vivo 遺伝毒性試験 QSAR の開発

In vivo 遺伝毒性試験のデータベース構築と発がん性感受性の検証 \_\_\_\_\_ 2 3

森田 健

構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究 \_\_\_\_\_ 6 9

小野 敦

反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究 \_\_\_\_\_ 7 9

広瀬 明彦

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) \_\_\_\_\_ 9 3

IV. 研究成果の刊行物・別刷 \_\_\_\_\_ 9 5

## I. 総括研究報告書

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関および、  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究  
（H27-化学-指定-005）

研究代表者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長

## 研究要旨

現在、世の中には数万種に及ぶ既存化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それら化学物質のリスク管理は、世界的な課題となっている。本研究では、規制の対象となるすべての化学物質のヒト健康リスクを評価するためのインシリコ手法を確立することことを目的とする。具体的には、カテゴリーアプローチと、構造活性相関（QSAR）手法により、各種毒性エンドポイントを定性的、もしくは定量的に予測する手法を開発、改良し、化学物質のヒト健康リスク評価に利用することを実現させる。

エームス試験に関しては、これまで構築してきた大規模データベース利用し、予測精度の向上を目指した競争的国際共同研究を組織した。H27年度は3,950化学物質のエームス変異原性の予測に世界7カ国のQSARベンダーが提供する16のQSARモデルが挑戦した。*In vivo*小核試験では379物質、トランスジェニック遺伝子突然変異試験では80物質からなる大規模*in vivo*遺伝毒性試験データベースを構築し、発がん感受性および*in vitro/in vivo*試験間の一貫性を評価した。今後、これらの知見をQSARモデルに組込む。

反復投与毒性については、無毒性量評価において、類似物質についての毒性情報が得られておらず化学構造のみからの評価が困難と判断される化学物質について、基本的な化学構造的特徴と短期毒性試験結果をもとにした毒性クラス判定の可能性について検討を行い、特定の化学構造的特徴を有する化学物質に限定すれば、予備試験レベルでの短期試験により無毒性量を外挿評価可能であることが示された。

また、肝毒性の評価に関しては、これまでの公表論文等のメカニズム情報を基に肝毒性アラートを作成する手法に代わる新たなアプローチとして、肝毒性に関連するkey eventを予測し、生体内経路の攪乱に關与する化合物群のプロファイルと組み合わせることによる肝毒性の予測モデルの作成を行った。Key Eventを特定するために、*in vitro* 肝毒性データから MIE (molecular initiating event) を特定し、有害転帰経路 (Adverse Outcome Pathway; AOP) に位置付けた。さらに、AOP wikiに収載された情報を用いてkey eventとAOPとの相関関係を構築した。

キーワード：定量的構造活性相関(QSAR)、カテゴリーアプローチ、データベース、遺伝毒性、反復毒性、肝毒性

## 研究分担者

本間正充

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

部長

森田 健

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部

室長

小野 敦

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部

室長

広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部

部長

### A. 研究目的

化学物質の規制に関わる国際機関や、各国規制当局の最近の関心の焦点は、規制の対象となるすべての化学物質を実験的に試験することなく、有害作用を引き起こす化学物質を同定するための単純なスクリーニングツールを確立することにある。構造活性相関、およびカテゴリーアプローチは、コンピュータトキシコロジーの重要な研究分野であり、有害作用を引き起こす可能性が高い化学物質を、その化学構造から*in silico*で予測する手法である。これら手法は統合型毒性評価系の重要な構成要素の1つであり、安全性評価が必要とされる化学物質の優先順位付けや絞り込みに有用である。また、毒性試験における動物利用の大幅な削減にも貢献できる。

本研究では、化学物質のヒト健康リスク評価の効率化や動物愛護の観点から定量的構造活性相関 (QSAR) やカテゴリーアプローチ手法の化学物質評価における実用化を目的として、それぞれについて規制へ適用可能な手法を構築および改良を行うとともに、最終的に得られた成果を基にした評価戦略の提案を行うことを目的としている。本年度は、これまでの研究成果を生

かし、QSARやカテゴリーアプローチ手法の実用化に向けて予測精度の向上を目指す。

エームス変異原性に関しては、これまで我が国で行われた エームス試験データを収集し、大規模データベースを再構築してきた。本データベースもつ化学物質の種類は世界最大規模になると予想され、かつ、個々の試験はOECDガイドラインに従い、GLP管理下で行われた試験であるため、信頼性の高いデータベースである。このデータをベンチマークデータセットとして、世界中のQSARベンダーに提供し、全てのQSARツールの予測率の向上を目指した国際共同研究を開始した (本間)。

染色体異常誘発性については、*in vitro*試験で陽性だが*in vivo*試験では陰性となるケースが多く知られている。そのため、より精度の高い染色体異常予測率を示すQSARモデルの構築には、*in vivo*試験の発がん物質感受性を評価し、*in vitro*と*in vivo*試験間のギャップの要因を検証する必要がある。そのため、CGXデータベースに、小核試験 (MN) と、トランスジェニック遺伝子突然変異試験 (TGR) の2種の*in vivo*遺伝毒性試験を加えた拡張版CGXを構築し、各試験の感受性/特異性を評価する。さらに、遺伝毒性指標を同じくする*in vitro/in vivo*試験間のデータ比較から、より信頼性の高い遺伝毒性試験QSARの開発を目指す (森田)。

反復投与毒性については、化学構造からの予測評価手法の実用化に向けて、評価対象とする化学物質について既知情報からの評価の可能性を判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、化学構造を指標として可能な限り効率的なリスク評価スキームを構築することを目指す (小野)。

臓器別の毒性予測に関しては、これまでの公表論文等のメカニズム情報を基に肝毒性アラートを作成する手法に代わる新たなアプローチとして、肝毒性エンドポイントに関連するkey eventモデルを予測し、生体内経路の攪乱に関与する化

化合物群のプロファイルと組み合わせることによる肝毒性の予測モデルの作成を行った（広瀬）。

## B. 研究方法

### B.1. エームス変異原性の予測精度の向上（本間）

安衛法によって実施された約23,000化学物質のエーム試験結果を精査し、QSARの開発に有用である12,451化学物質（内エームス陽性1,776化合物）をデータベース化した。そのうち3,950化合物のデータを共同研究のPhase Iデータとした。これらエームス試験の結果以下の3つに分類される。

- A判定：エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質
- B判定：エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質
- C判定：エームス試験における陰性判定物質

世界7カ国、11のQASRベンダーが共同研究に参画した。合計16のQSARツールが評価に提供され、Phase Iトライアルにチャレンジした。

### B.2. *In vivo*遺伝毒性試験QSARの開発（森田）

対象化学物質はカークランドらのCGXデータベースを基にした。データ収集には、総説、国際的化学品評価文書、NTPデータベースおよびPubMed等を用いた。試験結果は以下の4つに分類した。すなわち、+：陽性、-：陰性、E（不明確）およびTC（技術的に問題あり）。TGRにおける陽性は「少なくとも1つの発がん標的部位で陽性」、陰性は「TGRで評価したすべての発がん標的部位で陰性」とした。なお、*in vitro* CAにおいて、10 mM超および2 mg/mL超の濃度での陽性の知見は、これまでの研究成果に基づき陰性と判断した。

### B.3 構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究（小野）

既存化学物質安全性点検事業により、反復投与毒性試験（28日間試験もしくは反復投与生殖発生併合試験）が実施された化学物質について、本試験に先立って実施された予備試験の概要と本試験・予備試験それぞれにおけるNOAEL、LOAEL及び主な毒性所見を整理して、予備試験結果と本試験結果との比較解析及び基本的な物性や毒性クラス分類との相関について解析を行った。

### B.4. 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究（広瀬）

肝毒性に関連する経路およびKey Eventを特定するために、*in vitro* 肝毒性データを収集したMIP-DILIプロジェクトの研究成果を基礎としてMIE（Molecular Initiating Event）を特定し、有害転帰経路（Adverse Outcome Pathway; AOP）に位置付けた。さらに、AOP wikiに収載された情報を用いてkey eventとAOPとの相関関係を構築した。概念実証プロファイラーの作成には2種類のアプローチ（Derek Nexusのアラートパターンの利用とkey eventに関連する公開*in vitro*アッセイデータに関連する化合物群との構造的類似性を利用したリードアクロス法）を採用した。次にkey eventモデルと化合物プロファイラーを関連づけ、KNIME解析プラットフォームを用いて肝毒性の予測性能を評価した。

## C. 結果

### C.1. エームス変異原性の予測精度の向上（本間）

2014年12月までには11機関に化学物質の以下の情報を送付した。情報は、管理番号、CAS#、化学物質名、SMILESである。2015年9月末までに参加機関のQSARツールによるエームス試験判定予測結果を回収し、予測精度を評価した。

基本的な能力評価はA-Sensitivity、AB-Sensitivity、Specificityを用いた。A-Sensitivityは強いエームス陽性化合物を陽性判定する率で有り、規制側はこの値を最も重要視する。Specificityはエームス陰性化合物を陰性と

判定する率で、化学物質や、医薬品の開発にはこの数値が高いことが望まれる。最も高いA-Sensitivityを示したものはイタリアのマリオネギリ研究所のVEGA+MNとマルチケース社のCase-ULTRA(rule based)であった（ともに81.3%）。

今回の3,950化学物質には183の強いエームス陽性化合物が含まれる（A判定）。しかしながら、このうち8化合物については、16のQSARツールの全てが陰性を示した。これら化合物は”False Negative(偽陰性)”と考えられる。一方、3,380化合物はエームス陰性である（C判定）。しかしながら、このうち10化合物については、16のQSARツールの全てが陽性の判定をした（False Positive；偽陽性）。

### C.2. *In vivo* 遺伝毒性試験QSARの開発(森田)

*In vivo* MNでは379物質、TGRでは80物質のデータが認められた。感受性/特異性は、*in vivo* MNで41.0%/60.5%、TGRで72.4%/nc、エームス + *in vivo* MNで68.7%/45.3%、エームス + TGRで83.8%/ncであった。3試験を組合せた場合の感受性は、80%超であった。*In vitro/in vivo* 一致性は、*in vivo* MNと*in vitro* CAで50.3%、TGRとエームス試験で79.5%であった。27物質が*in vitro* CA陰性で*in vivo* MN陽性を示し、5物質がエームス試験陰性でTGR陽性、10物質がエームス試験陽性でTGR陰性を示した。

### C.3 構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究(小野)

特定の化学構造的特徴を有しており14日間予備試験でNOAELが求められている物質については、14日間NOAELの組み合わせで、スクリーニングレベルの評価が可能であることが示された。さらに、化学構造から計算可能な基本的な物性とCremer毒性分類との組み合わせにより評価対象物質を限定することでより信頼性の高い評価が可能であることが示された。

### C.4 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究(広瀬)

反復投与毒性データセットを作成したプロファイラーで処理して毒性予測を行った結果、感度は57%で、特異度は44%となった。さらに、高濃度でしか肝毒性を示さなかった化合物としてLOAELが1000 mg/kg超または250 m/kg超となる化合物を除外するとモデルの感度はそれぞれ63%および71%に向上することが示された。さらに、物理化学的な記述子のカットオフとして分子量の480未満またはClogP-5超を利用したところ、感度を同程度に維持したまま特異度が44%から58%に向上させることができた。

## D. 考察

### D.1. エームス変異原性の予測精度の向上(本間)

今回の3,950化合物の予測精度に関しては、ICH-M7を契機にエームス試験の予測性の向上に積極的に取り組んでいるラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社のQSARツールの予測性に期待が持たれた。3社は、知識ベース、統計ベースの両者のモデルを有する。概して、3社のツールはSensitivity、Specificityともバランスがよく、75~82%の一致率(Correspondence)を示した。一方、規制当局が懸念するA-Sensitivityに関しては、イタリアのマリオネギリ研究所のVEGA、およびVEGA+MNモデルが80%以上の検出率を示したが、一方Specificityは70%以下で有り、偽陽性が多くなることが懸念された。REACH(EU)、TSCA(米国)、化審法(日本)等の化学物質の管理のシーンでは実際の試験対象物質のスクリーニング、もしくは優先順位付けに有効かもしれない。

A-Sensitivityが低いツールとして、スイスのAZMES、スペインのSymmetry、ブルガリアのAMBIT、日本のADMEWORKSが挙げられる。これらのA-Sensitivityは60%以下で有り、多くの危険な化学物質を偽陰性と判断する可能性があ

る。今後の、改良が望まれる。

ほとんど全てのQSARツールの全てが陰性と間違っ判定した化学物質が全体の強いエームス陽性化学物質の10%も存在したことは、これらのQSARツールがいまだ未熟であることを示すと同時に、本プロジェクトの意義が明確になった。すなわち、様々な構造を有する化学物質の試験結果をデータベース化し、エームス陽性のケミカルスペースを拡大することが、偽陰性を減らすことに繋がるものと確信する。また、偽陽性も多く見つかった。警告アラートとは別に、それらアラートを修飾する部分構造や、トキシコフォーブを同定することが偽陽性の削減に役立つが、それに対しても多くの化学物質の情報が必要である。

#### D.2. *In vivo* 遺伝毒性試験QSARの開発 (森田)

*In vivo* MNの感受性は、*in vitro*試験より低かったが特異性はエームス試験に次いで高かった。TGRの感受性はエームス試験よりも高く、他の*in vitro*試験と同程度であった。エームス+ *in vivo* MN + TGRは高い感受性を示し、ICH S2(R1)のオプション2は、有効であることが示唆された。より精度の高いQSARの開発には、*in vitro* CA陰性で*in vivo* MN陽性の物質の特徴やそのメカニズムの検証、ならびに発がん標的臓器と遺伝子突然変異標的臓器の相違の要因（動物種、系統、投与期間、投与経路、化学物質の吸収や代謝など）の検討が必要と考えられる。

#### D.3. 構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究 (小野)

予備試験では、病理組織学的検査や血液生化学検査が実施されていない場合も多いが、それらの検査を実施することでより正確な評価（予測）が可能であり、類似物質についての毒性情報が得られておらず化学構造のみからの評価が困難と判断された化学物質について、基本的な化学構造的な特徴と短期毒性試験結果をもとに毒性クラスの効率的な判定が可能であると考察された。

#### D.4. 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究 (広瀬)

今後の研究として感度と特異度の両方を向上させるためには、偽陰性や偽陽性の化学物質クラスの解析等を行うことによって、様々なkey eventを予測する方法をさらに調査することが有用であることが示された。

#### E. 結論

エームス変異原性の予測精度の向上に関しては、エームス試験予測QSARモデルの向上を目指した国際共同研究を開始した。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSARモデルの開発に有用と考えられる12,000化学物質のをデータベース化した。H27年度はこのうち3,950化合物について、エームス試験結果の予測精度を競うPhase Iトライアルを行った。世界7カ国から、11のQSARベンダーがこの国際競争に参画し、16のQSARツールについて予測精度の評価を行った。多くのQSARツールの精度は高いものであったが、強い陽性化合物を適切に陽性と判定する能力のさらなる向上が望まれた。また、ほとんど全てのQSARツールで検出できない強いエームス陽性化合物が多く同定された。これら化合物は新規の変異原性アラートを有することが考えられる。多くの外部データで試験を行い、できるだけケミカルスペースを拡大させることが、QSARの予測精度の向上に繋がるものと考えられる。

*In vivo* 遺伝毒性試験に関しては、これまでになく大規模な試験データベースを構築した。*In vivo* MNの感受性/特異性は41.0%/60.5%、TGRの感受性は72.4%であった。エームス+ *in vivo* MNでは68.7%/45.3%、エームス+ *in vivo* TGRでは83.8%/ncであった。また、*in vitro/in vivo* 試験の一致性は、*in vivo* MNと*in vitro* CAで50.3%、TGRとエームス試験で79.5%であった。これらの*in vivo*知見あるいは*in vitro/in vivo*試験間の相違に関する知見をQSARに組込むことが精度向上に

必要である。

反復毒性については、単一のモデルやルールで全ての化学物質について評価を行うアプローチよりも、化学物質ごとに入手可能な類似物質の情報をもとに適用可能な評価手法を選択して評価を行う評価スキームのほうが化学物質規制における実用性は高いと考えられる。

また、肝毒性に関してはkey Eventを特定するために、*in vitro* 肝毒性データを収集したMIP-DILIプロジェクトの研究成果を基礎としてMIEを特定し、有害転帰経路AOPに位置付けた。Key eventとAOPとの相関関係を構築は毒性評価の新しい可能性をもたらすものとする。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 誌上発表

Barber C, Amberg A, Custer L, Dobo KL, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Harvey J, Honma M, Kenyon MO, Kruhlak N, Muster W, Stavitskaya L, Teasdale A, Vessey J, Wichard J; Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 73, 367-377 (2015)

Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Williams RV, Hamada S, Hirose A, Honma M, Morita T; Using *in vitro* structural alerts for chromosome damage to predict *in vivo* activity and direct future testing. *Mutagenesis*, 31, 17-25 (2015)

Petko IP, Patlewicz G, Terry, Schultz W, Honma M, Todorov M, Kotov S, Dimitrov SD, Donner M, Mekenyan OG; A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting

carcinogenicity? *Regul. Tox. Pharm.*, 72, 17-25 (2015)

Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M; Evaluation of the sensitivity and specificity of *in vivo* erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutation Research*, 802, 1-29 (2016)

Morita T, Uno Y, Honma M, Kojima H, Hayashi H, Tice RR, Corvi R, Schechtman L, The JaCVAM International Validation Study on the *in vivo* Comet Assay: Selection of Test Chemicals. *Mutation Research*, 786-788, 14-44 (2015)

森田 健 ; LD50値による毒性評価手法の変遷、*中毒研究*, 28, 388-391 (2015)

Hirata-Koizumi M, Fujii S, Hina K, Matsumoto M, Takahashi M, Ono A, and Hirose A; Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats: perfluorohexadecanoic acid and perfluorotetradecanoic acid. *Fundam Toxicol Sci*, 2(4) 177-190 (2015)

Igarashi Y, Nakatsu N, Yamashita T, Ono A, Ohno Y, Urushidani T, Yamada H; Open TG-GATEs: a large-scale toxicogenomics database. *Nucleic Acids Res*, 43 (Database issue) D921-D927 (2015)

Okamura H, Abe H, Hasegawa-Baba H, Saito K, Sekiya F, Hayashi S, Mirokuji Y, Maruyama S, Ono A, Nakajima M, Degawa M, Ozawa S, Shibutani M, and Maitani T; The Japan

Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of acetal food flavouring substances uniquely used in Japan. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(9) 1384–1396 (2015)

Ono A, Kobayashi K, Serizawa H, Kawamura T, Kato H, Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Matsushima Y, Hirose A; A repeated dose 28-day oral toxicity study of  $\beta$ -bromostyrene in rats. *Fundam Toxicol Sci*, 2(4) 191–200 (2015)

松本真理子、清水将史、宮地繁樹、菅谷芳雄、広瀬明彦; OECD化学物質共同評価プログラム、第6回化学物質共同評価会議概要 化学生物総合管理, 11, 37-45, 2015.

#### 学会発表

Honma M; Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines. 39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society of India (2015.5, Impal, India)

Honma M; Ames QSAR Collaborative Study. ICCA - LRI workshop (2015.6, New Orleans, USA)

本間正充; OECDテストガイドラインの変更点. JEMS・MMS研究会 第66回定例会 (2015.6、那須)

本間正充; ICH-M7ガイドラインとExpert Review 微生物変異試験研究会第53回定例会 (2015.11、福岡)

Morita T; GHS classification of CMR substances in EU and Japan, AsiaTox 2015、済州島、韓国、2015年6月23-26日.

森田 健; CMR物質のGHS分類比較: EUと日本、第42回日本毒性学会、金沢、2015年6月29日-7月1日.

森田 健; LD50値による毒性評価と行政利用、第37回日本中毒学会合同シンポジウム、和歌山、2015年7月17-18日.

Morita T, Hamada S, Masumura K, Honma M; Detection of rodent carcinogens and non-carcinogens by in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent mutation tests, EEMS 2015, 23-27 August 2015, Prague, Czech Republic.

森田健、濱田修一、増村健一、本間正充; *In vivo* 赤血球小核試験とトランスジェニック齧歯類突然変異試験による齧歯類発がん物質の検出、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27~28日、九州大学.

森田健、畝山智香子; カラメル色素中の4-メチルイミダゾールのリスク評価、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27~28日、九州大学.

Hirose A, Hirata-Koizumi M, Kawamura T, Matsumoto M, Takahashi M, Nishimaki-Mogami T, Nishimura T, Ema M, Ono A; Derivation of subacute reference doses for drinking water quality management. The 51st EUROTOX2015 (2015.9, Porto, Portugal)

Nishimura T, Hirata-Koizumi M, Yamada T, Kawamura T, Ono A, Hirose A, Ema M; Derivation of the health advisory guidance values for sub-acute exposure of drinking water. Society of Toxicology 55th Annual meeting (2016.3, New Orleans, USA)

Ono A, Matsumoto M, Takahashi M, Kawamura T, Hirata-Koizumi M, Hirose A: Is a 14-day dose setting study able to predict its 28-day repeated dose toxicity?. The 51st EUROTOX2015 (2015.9, Porto, Portugal)

Hirose A: Japanese Current Chemical Regulation and Contribution to the OECD Cooperative Chemicals Assessment Programme (CoCAP). The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology. (2015.7. チェジュ、韓国)

Hirose A: Metal contaminants in drugs: ICH point of view. The 9th Congress of Toxicology in Developing Countries. (2015.10. ナタール, ブラジル)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## II. 分担研究報告書

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関および、  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究

分担研究課題名：エームス変異原性の予測精度の向上に関する研究

研究分担者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部	部長
研究協力者	山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部	第一室長
研究協力者	北澤 愛莉	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部	

## 研究要旨

エームス試験予測QSARモデルの向上を目指した国際共同研究を開始した。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSARモデルの開発に有用と考えられる12,451化学物質をデータベース化した。平成27年度はこのうち3,950化合物について、エームス試験結果の予測精度を競うPhase I トライアルを行った。世界7カ国から、11のQSARベンダーがこの国際競争に参画し、16のQSARツールについて予測精度の評価を行った。多くのQSARツールの予測精度は比較的高く、実際のエーム試験との一致率は70-80%程度であった。しかしながら、強い陽性化合物を適切に陽性と判定する能力は十分ではなく、偽陰性が多く出ることが懸念され、化審法に基づく化学物質の管理等に実用化するためにはさらなる向上が必要と考えられた。また、ほとんど全てのQSARツールで検出できない強いエームス陽性化合物が多く同定された。これら化合物は新規の変異原性アラートを有することが考えられる。様々な構造を持つ化学物質での試験データを収集し、できるだけケミカルスペースを拡大させることが、QSARの予測精度の向上に繋がるものと考えられる。研究結果は各QSARベンダーで共有し、更に実際のエームス試験結果を開示した。QSARベンダーはこの結果を取り入れ、Phase II トライアルに向けてモデルの改良を行う。このような公正な競争により各QSARツールの予測性が格段に向上することが期待される。

キーワード：エームス試験、安衛法、化審法、QSAR、国際共同研究

### A. 研究目的

EU 各国および米国EPA においては、既存化学物質のリスク管理の目的で、安全性評価未実施の物質を対象にカテゴリーアプローチおよび、定量的構造活性相関（QSAR）の利用が検討されている。特に、医薬品における変異原性不純物の評価にQSAR の利用を明文化したICH-M7ガイド

ラインが2015年1月から適用されたことから、一般化学物質のヒト健康リスク評価・管理への適用にも拍車がかかると思われる。

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部ではこれまで我が国で行われた エームス試験データを収集し、大規模データベースを再構築してきた。本エームス試験データベースは2万化学物質以上からなり、現在で

は世界最大規模のデータベースである。また、個々の試験はOECDガイドラインに従い、GLP管理下で行われた試験であるため、その信頼性も高い。この最大且つ、信頼性の高いエームス試験データはエームス試験ベンチマークデータセットとして内部利用している。このデータベースの中で、未公開データを、外部評価データとしてQSARベンダーに提供し、世界中で汎用されているQSARツールの予測性の検証と、改良を行うことが本研究の目的である。

未公開のエームス試験データは主に安衛法に従って、化学・製薬メーカーが要求され、自社、もしくは外部の試験受託機関で、GLPで試験されたデータである。安衛法では、労働者が曝露する可能性がある年間100kg以上の中間体を含む化学物質について試験をすることを求めており、その化学物質の種類は多岐にわたるため、極めて有用なデータベースである。安衛法のエームス試験データは2万化合物を超えるが、このうち、高分子ポリマー、混合物、金属化合物を除き、QSARモデルの開発に有用と考えられる12,451の低分子化学物質のデータベースを構築した。

国際共同研究では、これら試験データを3～4回に分けて、エームス試験結果を伏せたままQSARベンダーに提供する。各QSARベンダーは計算した予測結果を、本研究班に伝え、本研究班でその予測率を評価する。評価後、各QSARベンダーに実際のエームス試験結果を開示する。各QSAR開発者はその結果を基に、QSARモデルや、トレーニングセットを改良し、次のトライアルに参加する。このようなトライアルを繰り返すことにより、全てのQSARツールの

予測性の向上が期待できる。本年度は、この国際共同研究に向けたデータベースの整備と、第1回目(PhaseI)のトライアルを行った。

## B. 研究方法

### B.1. エームス試験データベースの再構築：

これまで収集したエームス試験データベースの概要を述べる。

最初の903のデータはエーザイ株式会社澤田博士から提供された。このデータベースは、公開されている安衛法試験データ、医薬品、既存化学物質、国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部で監修した「微生物を用いる変異原性試験データ集」からのデータからなる。データ形式、インデックス形式を決定し、これを「AmesDB903」とした。今後のデータは全て、「AmesDB903」と同じフォーマットとして入力した。

食品安全委員会食品安全総合情報システム検索サイトに掲載されている評価書から「food」データベースを作成した(105化合物)。

公開されている既存化学物質データベースから「kashinhou1」を作成した(221化合物)。

小野らの論文の掲載の香料のデータから「JECFA(FCT6389)」を作成した(367化合物)。

ハンセンらの論文に掲載のデータから「Hansen」を作成した(6,512化合物)。

非公開データである化審法の新規化学物質のエームス試験データから「kashinhou2」を作成した(199化合物)。

最後に、本研究事業で用いる未公開の労働安全衛生法に基づき実施された変異原性

試験データから「labor」を作成した(20,760化合物)。

現在の国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部で維持、管理しているエームス試験データベースを表1に示す。

## B.2. 安衛法データベース

データベースの中の「labor」の試験データは厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課よりデータの提供を受けた。これはデータは、本共同研究でのみ使用することが許され、第3社への提供は行わない。また、共同研究に参加するQSARベンダーとは、公表データ(職場の安全サイト情報)を除き、データの第3社への提供、他の目的への流用は行わない旨の誓約書を取り交わした。入手したファイルはAとBの2種類であり、次のようなエクセルシートで構成されていた。

### I：変異原性評価リスト

変異原性試験結果シートとデータの留意事項シートの二つで構成されていた。

- 変異原性試験結果シートには分類ID(安衛法官報公示整理番号)、Ames試験判定、官報整理番号が記載されていた。
- データの留意事項シートにはAmes試験判定、インデックスの説明が記載されていた。

### II：職場の安全サイト文字情報

Web公開用に作成された物質情報シートと、留意事項シートの二つで構成されていた。

- 物質情報シートには物質名称(和名)、CAS番号、分類ID、官報公示時期などの日付データが記載され

ていた。

- 留意事項シートには情報の公示時期、公開時期についての説明が記載されていた。

これら元データから以下の条件を考慮しデータを精査した。

- ① 除外対象物質、混合物、ポリマー、縮合物、有機金属を、物質名称から判断してA、B両ファイルから除外した。
- ② A、B両ファイルを共通の分類IDを用いて結合し、「変異原性評価リスト」(C)とした。
- ③ Cの各物質のデータを確認し、物質名称(和名)とCAS番号について、外部の化学物質検索サイト(NTP database、Chem Spider、PubChem、J-Global、日本化学物質辞書web\*)と照合し、誤記と判断されたものについて修正した。
- ④ データ項目の中では、分類IDが最も信頼できると考え、それに基づき検索が可能な『日本化学物質辞書web』を利用することにした。ただし、当該サイトのデータソースが厚労省のデータであるため、CAS番号の誤記等が共通していた。
- ⑤ データの信頼性確保のため、『PubChem(USA)』を併用することにした。
- ⑥ SMILES形式の構造式情報と物質名称(英名)を、CAS番号をもとに上記5のPubChem(USA)で検索して、物質データのカラムに加えた。
- ⑦ CAS番号がない物質および、PubChem(USA)に掲載がない物質

のSMILES形式と物質名称（英名）については、上記4の日本化学物質辞書webで検索して情報を入手した。データのうち、物質名、CAS番号、構造についての情報を得た。

以上の精査により「labor」ユニークな化学物質の種類は12,451化学物質（内エームス陽性1,776化合物）となった。

### B.3. 試験データの提供

12,451化合物の内CAS番号がある約8,000物質についてQSARで計算できる形式に変換した。8,000物質のうち、4,018のデータをまとめ、共同研究Phase Iデータとした。これらエームス試験の結果以下の3つに分類される（表2-1）。

- A判定:エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質
- B判定:エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質
- C判定:エームス試験における陰性判定物質

### B.4. 共同研究参加機関

2014年7月にイタリアミラノで開催された国際学会「QSAR2014」において、本共同研究を呼びかけたところ、世界7カ国、11のQASRベンダーが共同研究に参画した。合計16のQSARツールが評価に提供され、Phase Iトライアルにチャレンジした（表3）。

## C. 結果

2014年12月までに11機関に4,018化学

物質の以下の情報を送付した。情報は、管理番号、CAS#、化学物質名、SMILESである。エームス試験結果については開示していない。2015年12月末までに参加機関のQSARツールによるエームス試験判定予測結果を回収し、予測精度を評価した。

### C.1. 非評価対象とする化合物

Phase Iで提供した4,018物質の中には混合物であるためQSARによる計算が困難である化合物、もしくはイオン化合物であり、中性化によって既存の化合物と同一の化合物となるものが複数存在することが明らかとなった。これらは68化合物であった。これら物質を評価対象とすると、ドメイン適用率や、予測率が低下することが予想されたため、共同研究参加者の同意の下、これら68化合物を評価対象から外した。新たに評価対象とする3,950物質の内訳を表2-2に記載した。

### C.2. 3,950化合物のQSARによるエームス試験結果の予測

表4に11のQSARベンダーが提供する16のQSARツールによるエームス試験予測結果を示す。ブルガス大学提供する“OASIS TIMES”は代謝物をメカニズムベースで予測するツールを含んでおり、情報となるドメイン構造が少ないため、ドメイン内とドメイン外で別々に計算した。ラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社は知識ベース、統計ベースの2つのQSARツールを提供した。イタリアのマリオネグリ研究所は、3つの統計ベースのQSARツールを提供した。

基本的な能力評価はA-Sensitivity、

AB-Sensitivity、Specificityを用いた。A-Sensitivityは強いエームス陽性化合物を陽性判定する率で有り、規制側はこの値を最も重要視する。Specificityはエームス陰性化合物を陰性と判定する率で、化学物質や、医薬品の開発にはこの数値が高いことが望まれる。最も高いA-Sensitivityを示したものはイタリアのマリオネギリ研究所のVEGA+MNとマルチケース社のCase-ULTRA(rule based)であった(ともに81.3%)。

### C.3. QSARで検出できない強いエームス陽性化合物 (偽陰性)

今回の3,950化学物質には183の強いエームス陽性化合物が含まれる(A判定)。しかしながら、このうち8化合物については(図1)、16のQSARツールの全てが陰性、もしくは評価不能と判定をした。また、11の化合物については1つのQSARツールを覗き全て陰性の判定であった。これら化合物は”False Negative(偽陰性)”と判定されたと考えられる。

### C.4. QSARで検出できないエームス陰性化合物

今回の3,950化学物質のうち3,380化合物はエームス陰性である(C判定)。しかしながら、このうち10化合物については(図2)、16のQSARツールの全てが陽性の判定をした。また、23の化合物については1つのQSARツールを覗き全て陽性の判定であった。これら化合物は”False Positive(偽陽性)”と判定されたと考えられる。

## D. 考 察

これまで開発されたQSARツールの予測性の検証には、多くの場合、開発者が有する内部データによって検証されてきた。内部データはQSAR開発のためのトレーニングデータセットを含むため、その予測率が高いのは同然で有り、客観的評価となっていない。特に、化学メーカーや製薬企業が公開するデータの多くは、エームス陰性化合物で有り、それを基に開発されるQSARツールは、Specificityは高いものの、Sensitivityは低い、もしくはその値は信頼性に乏しい。規制当局に取っては、スクリーニング試験であるQSARはSensitivityが十分に高いことが必須である。これにより、変異原性にハザードの高い化学物質が、安易に環境中に放出されること無く、適切に管理されることが可能となる。従って、外部データを用い、QSARモデル、QSARツールの精度を評価することは、QSAR開発ベンダーにとっても、QSAR利用者にとっても、そして規制側にとっても有益な情報を与えてくれる。また、これら結果を各QSARベンダーで共有し、更に実際に試験データを開示することは、QSARベンダーの公正な競争により各QSARツールの予測性の向上に繋がる。本研究班では、このような研究を通じ、QSARベンダー、QSARユーザー、規制当局が”ウィン、ウィン、ウィン”の関係となることを目指す。

今回の3,950化合物の予測精度に関しては、ICH-M7を契機にエームス試験の予測性の向上に積極的に取り組んでいるラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社のQSARツールの予測性に期待が持たれた。3社は、知識ベース、統計ベースの両者のモデルを有する。概して、3社のツールは

Sensitivity、Specificityともバランスがよく、75～82%の一致率 (Correspondence) を示した。一方、規制当局が懸念する A-Sensitivity に関しては、マリオネグリ研究所の VEGA、および VEGA+MN モデルが 80% 以上の検出率を示したが、一方 Specificity は 70% 以下で有り、偽陽性が多くなることが懸念された。REACH (EU)、TSCA (米国)、化審法 (日本) のような化学物質の管理のシーンでは、このような高い Sensitivity を有する QSAR ツールは、化学物質の初期スクリーニングや実際に試験をするために優先順位付けに有効かもしれない。

ブルガス大学の TIMES モデルも高い Sensitivity を示したが、適用ドメインが 14.5% と極めて低かった。TIMES には薬物代謝モデルが組み込まれているが、本プロジェクトでは化学物質の代謝情報に関しては開示していない。今後、TIMES によるモデルの向上には、エーム試験の S9 の条件の有無、仕様菌株の情報などが必要と考えられる。

A-Sensitivity が低いツールとして、スイスの AZMES、スペインの Symmetry、ブルガリアの AMBIT、日本の ADMEWORKS が挙げられる。これらの A-Sensitivity は 60% 以下で有り、多くの強い変異原物質を偽陰性と判断する可能性がある。今後の、改良が望まれる。

ほとんど全ての QSAR ツールの全てが陰性と間違えて判定した化学物質が全体の強いエームス陽性化学物質の 10% も存在したことは、これらの QSAR ツールがいまだ未熟であることを示すと同時に、本プロジェクトの意義が明確になった。すなわち、様々

な化学構造を有する化学物質の試験結果をデータベース化し、エームス陽性のケミカルスペースを拡大することが、偽陰性を減らすことに繋がるものと確信する。また、偽陽性も多く見つかった。警告アラートとは別に、それらアラートを修飾する部分構造や、トキシコフォーブを同定することが偽陽性の削減に役立つ。さらに多くの化学物質の情報と、予測のためのパラメータの組み合わせやアルゴリズムの変更が必要である。

平成 28 年度からは約 3,800 の化合物を提供した Phase II チャレンジを行う予定である。現在の Phase I の情報を基に、各 QSAR ツールはバージョンアップし、予測精度が向上することを期待する。

## E. 結 論

エームス試験予測 QSAR モデルの向上を目指した国際共同研究を開始した。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSAR モデルの開発に有用と考えられる 12,000 化学物質のをデータベース化した。H27 年度はこのうち 3,950 化合物について、エームス試験結果の予測精度を競う Phase I トライアルを行った。世界 7 カ国から、11 の QSAR ベンダーがこの国際競争に参画し、16 の QSAR ツールについて予測精度の評価を行った。多くの QSAR ツールの精度は高いものであったが、強い陽性化合物を適切に陽性と判定する能力のさらなる向上が望まれた。また、ほとんど全ての QSAR ツールで検出できない強いエームス陽性化合物が多く同定された。これら化合物は新規の変異原性アラートを有することが考えられる。多くの外部データで試験を

行い、できるだけケミカルスペースを拡大  
せることが、QSARの予測精度の向上に繋  
がるものと考えられる。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 誌上発表

Barber C, Amberg A, Custer L, Dobo KL,  
Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S,  
Harvey J, Honma M, Kenyon MO,  
Kruhlak N, Muster W, Stavitskaya L,  
Teasdale A, Vessey J, Wichard J;  
Establishing best practise in the  
application of expert review of  
mutagenicity under ICH M7. *Regul  
Toxicol Pharmacol.*, 73, 367-377 (2015)

Canipa S, Cayley A, Drewe WC,  
Williams RV, Hamada S, Hirose A,  
Honma M, Morita T; Using in vitro  
structural alerts for chromosome damage  
to predict in vivo activity and direct  
future testing. *Mutagenesis*. 31, 17-25  
(2015)

Petko IP, Patlewicz G, Terry, Schultz W,  
Honma M, Todorov M, Kotov S, Dimitrov  
SD, Donner M, Mekenyan OG; A  
feasibility study: Can information  
collected to classify for mutagenicity be  
informative in predicting carcinogenicity?

*Regul. Tox. Pharm.*, 72, 17-25 (2015)

##### 学会発表

Honma M; Trend and Progress of OECD  
Genotoxicity Testing Guidelines. 39th  
Annual Meeting of Environmental  
Mutagen Society of India (2015.5、インパ  
ール、インド)

Honma M; Ames QSAR Collaborative  
Study. ICCA - LRI workshop (2015.6、ニ  
ューオリンズ、米国)

本間正充 ; OECDテストガイドラインの変  
更点. JEMS・MMS研究会 第66回定例会  
(2015.6、那須)

本間正充 : ICH-M7ガイドラインとExpert  
Review 微生物変異試験研究会第53回定例  
会 (2015.11、福岡)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 入力済みデータベース一覧

データベース名	データ出典 <sup>1)</sup>	全データのAmes試験結果 <sup>2)</sup>					除外物質を除いたAmes試験結果 <sup>3)</sup>				出典データ情報
		陽性 <sup>4)</sup>	疑陽性 <sup>5)</sup>	陰性 <sup>6)</sup>	その他 <sup>7)</sup>	合計 <sup>8)</sup>	陽性 <sup>4)</sup>	疑陽性 <sup>5)</sup>	陰性 <sup>6)</sup>	合計 <sup>8)</sup>	
AmesDB903	労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験結果(公開)	114	3	200	0	903	102	3	173	736	労働安全衛生法 有害性調査精度に基づく 既存化学物質 変異原性データ集 および補遺1~3版
	医薬品関連情報	10	0	161	0		6	0	100		独立行政法人 医薬品医療機器総合機構検索
	既存化学物質毒性データベース	25	2	161	0		22	2	149		国立医薬品食品衛生研究所 既存化学物質毒性データベース 検索
	微生物を用いる変異原性試験データ集	40	0	187	0		37	0	142		微生物を用いる 変異原性試験データ集 ISBN 4-900487-13-0
food	食品安全委員会 評価書	12	3	90	0	105	12	3	83	98	食品安全委員会 食品安全総合情報システム 評価書検索
labor	労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験結果 昭和54年~平成24年(非公開)	2375 (A790,B1585)	0	18054	331	20760	1776 (A677,B1099)	0	10675	12451	厚生労働省 職場のあんぜんサイト検索
kasinhou1	化審法 審査シートデータ(既存)	13	0	189	19	221	9	0	152	161	化学物質審査規制法に基づき実施された変異原性試験結果審査シートデータ(2003-2006年)
kasinhou2	化審法 審査シートデータ(新規)	9	0	168	22	199	3	0	106	109	化学物質審査規制法に基づき実施された変異原性試験結果審査シートデータ(2007-2014年)
JECFA(FCT6389)	Food and Chemical Toxicology FCT6389 掲載の香料	24	14	329	0	367	23	14	310	347	Ono A. et al., Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals. Food Chem. Toxicol., 50, 1538-1546. (2012) 6.
Hansen	J. Chem. Inf. Model. 掲載のQSARベンチマークデータ	3503	0	3009	0	6512	3299	0	2462	5761	Hansen et. al., 2009. Benchmark Data Set for In Silico Prediction of Ames Mutagenicity.
合計		6125	22	22548	372	29067	5289	22	14352	19663	